

Témavezető neve: Prof. Dr. Muszbek László

A téma címe: A véralvadás XIII-as faktora

A kutatás időtartama: 2003-2005.

## **I. A XIII-as faktor (FXIII) struktúrája és funkciója**

### 1/ A FXIII aktivációjának vizsgálata molekula modellezési, molekuláris biológiai és fehérje biokémiai módszerekkel

#### *a. Az aktivációs peptid lehasítása és szerepe az aktivált FXIII stabilizációjában*

A thrombin aktív helyéhez dokkolt modell FXIII aktivációs peptid (AP) fragmens („extended” konformáció) és a kísérleti röntgendiffrakciós ( $\beta$ -turn konformáció, Sadasivan és Yee: J.Biol. Chem., 275, 36942, 2000) szerkezetekből kiindulva molekula-dinamikai szimulációkat végeztünk, hogy (a) megállapítsuk, hogy a thrombin-FXIII kölcsönhatás során melyik konformáció a valószínűbb és (b) ezt a valószínűséget hogyan befolyásolja a Val34Leu polimorfizmus. Bár 3ns szimulációs idő (AMBER program) alatt  $\beta$ -turn- $\rightarrow$  „extended” vagy „extended”- $\rightarrow$   $\beta$ -turn konformációs változást nem észleltünk, az megállapítható volt, hogy a Leu34 variáns a  $\beta$ -turn konformációt kevésbé preferálja a Val34 variánsnál. Ebből, valamint molakulagrafikai analízisből és szabadentalpia perturbációs módszerrel kapott eredményeinkből (AMBER) azt a következtetést vontuk le, hogy a FXIII-thrombin kölcsönhatás során az AP az “extended” konformációt preferálja a  $\beta$ -turn-nel szemben. Eredményeink tehát az oldatfázisú NMR mérésekből levonható (Trumbo és Maurer: Biochemistry, 41, 2859, 2002) következtetéseket támasztják alá szemben a röntgendiffrakciós mérések eredményeivel.

A FXIII röntgendiffrakciós szerkezetéből kiindulva molekula szimulációs in silico kísérlet sorozat elvégzését kezdtük el a teljes FXIII A<sub>2</sub> dimerjére explicit oldószermodellt alkalmazva. Bár a rendkívül időigényes szimulációs kísérlet sorozat (a szimulált rendszer több mint 200 ezer atomot tartalmaz) még távolról sem tekinthető befejezettnek, a szimulációs trajektória analíziséből: 1) A fentebb említett  $\beta$ -turn konformáció akár átmeneti meglétét eddig nem észleltük. 2) AP hasítási helyének környezetében a peptidlánc különösen flexibilisnek adódik. (Ez érthető, hiszen az adott peptidszakasznak optimális konformációt kell felvenni a thrombin-FXIII kölcsönhatáshoz; értelmezhetővé válik egyúttal az is, hogy az adott szerkezeti részlet miért nem „látszik” röntgendiffrakciós módszerrel.) 3) Az AP a core domain-hez (többek között) erős sóhidas hidrogén kötésekkel kötődik, amelyek a szimuláció eddigi (~4ns-ot felölelő) szakaszában intaktak maradtak. (Ezeknek valószínűleg döntő szerepük van abban, hogy a thrombin által már lehasított AP továbbra is a FXIII felületén marad.) A molekula modellezéssel kapott eredmények mára álltak össze úgy, hogy közlemény formájában is publikálhassuk.

Elméleti megfontolásokból eddig egy rekombináns mutánszt állítottunk elő és vizsgáltunk. Ebben a 37-es pozícióban lévő arginint glutaminra cseréltük (R37Q), s vizsgáltuk az így előállított fehérje aktivációját. Kimutattuk, hogy a thrombin a Q37 mutánszt nem képes hasítani, ugyanakkor Ca<sup>2+</sup> jelenlétében a vad típusú celluláris FXIII-hoz hasonlóan a mutáns zimogén formában is aktiválódik, s ezt a nem proteolitikus aktivációt a magas ionerő mindkét esetben jelentősen meggyorsítja. Az eredmények azon korábbi feltételezésünket támasztják alá, mely szerint az aktivációs peptid hasítása nem szükséges az enzim aktív centrumának kialakításához, és a transzglutamináz aktivitás megjelenéséhez. Utóbbi kísérletek kapcsolódnak a kutatási program I/1/c pontjához (a Ca<sup>2+</sup> kationok szerepe a proenzim aktiválásában). A

munkának ez a része nemzetközi kongresszuson bemutatásra került, de ahhoz, hogy közlemény formájában is megjelenhessen nagyobb mennyiségű mutáns fehérjét igénylő részletes biokémiai-enzimológiai karakterizálásra van szükség. Jelenleg tudunk beszerezni egy erre alkalmas készüléket, melynek segítségével megkezdjük a mutáns fehérje sejtmentes expresszióval nagy mennyiségben történő előállítását.

Az aktivációs peptid szerepének további vizsgálatára olyan rekombináns mutánst kíséreltünk meg expresszálni, melyből hiányzik az aktivációs peptid, és  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében spontán aktiválódik. Ilyen mutáns előállítására vonatkozó kísérleteink azonban nem hoztak eredményt. A mRNS vad típusnak megfelelő mennyiségben történő képződése ellenére enzimatis aktivítással rendelkező fehérjét nem észleltünk, s a fehérje a sejtben szinte azonnal degradálódott. Ez felvetette azt a lehetőségét, hogy a FXIII-A az aktivációs peptid nélkül (vagy annak lehasadásával!) instabillá válik, azaz, maga az aktivált FXIII is instabil, s spontán elveszti aktivitását. Legújabb, az utolsó félévben elkezdett vizsgálataink ezt támasztják alá. Kimutattuk, hogy az aktivált FXIII aktivitása 37 °C-on inkubálva gyorsan csökken. Ugyanakkor semmiféle proteolízis nem detektálható. Az eredményeknek az adja meg a jelentőségét, hogy eddig az aktivált FXIII down-regulációjára vonatkozóan semmiféle elképzelésünk sem volt, s ez a spontán down-reguláció megmagyarázhatja, miért nem képződik extrémén keresztkötött, a fibrinolitikus rendszerek által eltávolíthatatlan fibrin az alvadás során.

*b. A FXIII-A Val34Leu polimorfizmus hatása a FXIII proteolitikus aktivációjára plazmában, illetve teljes vérben.*

A kísérletek során plazmához thrombint adtunk, s komplex plazma környezetben vizsgáltuk a fibrinképződést, a fibrin  $\gamma$  lánc FXIII által történő keresztkötését, a FXIII inkorporációját a fibrinhálóba és a FXIII proteolitikus aktiválását (az aktivációs peptid lehasadását), illetve e jelenségek időbeli viszonyát. Kimutattuk, hogy a FXIII teljes mértékben inkorporálódik a fibrin hálóba és proteolitikus aktiválódása a fibrin felületén történik meg. Az aktivált FXIII a fibrin háléhoz kötve marad, soha nem jelenik meg a plazmában vagy szérumban. A FXIII aktiváció beindulása a fibrin polimerizáció kezdetétől függ, s arra nincs hatással a Val34Leu polimorfizmus. Ugyanakkor azt, hogy a FXIII aktivációja milyen késéssel követi a fibrin polimerizációt a Val34Leu polimorfizmus lényegesen befolyásolja, s Leu34 esetében a lag fázis igen rövid. E konklúziót olyan kísérletekkel is bizonyítottuk, melyekben nagy tisztaságú Val34, illetve Leu34 homozigóta egyénekből izolált FXIII-t adtunk FXIII hiányos plazmához (ez esetben a fibrin polimerizáció ugyanakkor következett be, és a Val34Leu polimorfizmus hatása a fibrin polimerizációtól függetlenül volt vizsgálható). Megkíséreltük a vizsgálatokat teljes vérben is elvégezni, szöveti tromboplasztinnal indítva az alvadás folyamatát. Ez esetben azonban olyan sok változós rendszer befolyásolta a trombin képződés idejét, sebességét és a keletkezett trombin mennyiségét, hogy a rendszer nem látszik alkalmasnak érdemi következtetések levonására. A résztémából elkészült közlemény közlés alatt áll.

2/ A FXIII A és B alegységek asszociációjáért felelős strukturális elemek

*a. A két típusú alegység összekapcsolódását akadályozó monoklonális ellenanyagok szelektálása.*

A FXIII A és B alegységei ellen eddig mintegy 100 monoklonális ellenanyagot állítottunk elő. Az A alegység ellen termelt mintegy negyven monoklonális antitest közül két olyat találtunk, melyek csak akkor kötődnek az A alegységhez, ha az szabad dimer ( $\text{A}_2$ ) formában van, azaz nincs komplexben a B alegységgel. Ugyanakkor ezek

az antitestek, amennyiben először az A alegységhez kötődtek nem tudták megakadályozni a B alegység bekötődését. Ebből arra következtettünk, hogy vagy a B alegység leszorítja a gyengébb affinitású antitesteket az A alegységről, vagy az A<sub>2</sub> formában lévő A alegységen meglévő az antitestekkel reagáló strukturális epitóp(ok) konformáció változás következtében eltűnnek a B alegységgel képződő tetramer (A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) kialakulása során.

Az első B alegység ellen termelt monoklonális antitest széria során képződött közel 60 monoklonális antitest között nem találtunk olyat melyek csak a szabad B alegységhez kötődnének. Egy újabb immunizáció során azonban 5 olyan monoklonális antitestet is sikerült előállítani melyek csak az izolált B alegységgel reagálnak, az A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> tetramerrel nem, ill. amelyek a B alegységgel reagálva megakadályozzák annak A alegységgel képzett komplexét. A kiválasztott antitestek ELISA módszerrel végzett kötődési vizsgálatait az elmúlt év utolsó hónapjában beszerzett Biacore készülékkel kívánjuk kiegészíteni.

*b. A komplex képződést gátló ellenanyagokkal reagáló epitópok, ill. mimotópok identifikálása és lokalizációja az alegységek strukturájában*

Az eredeti tervek szerint az epitóp keresését „phage display” technikával terveztük. Ez a technika azonban hosszas keresés ellenére nem hozott értékelhető eredményeket. Ezért új epitóp keresési technikák bevezetésével próbáltuk(juk) megközelíteni a problémát. Az egyik ilyen a hidrogén-deutérium (vagy deutérium-hidrogén) cserét követő pepszines emésztésen és MALDI-TOF technikával történő peptid identifikáláson alapuló technika. Ennek segítségével sikerült a B alegységen olyan peptidet találni ahol a H-D (D-H) csere lényegesen kisebb, mint a többi peptid esetében. Jelenleg ezen peptidok identifikálása folyik. Párhuzamosan megkezdtük a Pepscan technika epitóp keresés céljára történő felhasználását is.

*c. Vizsgálatok FXIII-B deléció és szubsztitúció (kiméra) mutánsokkal*

Ezen új molekuláris genetikai megközelítés keretében klónoztuk a FXIII B alegységét és az 5 sushi doménnel rendelkező fehérje esetében olyan mutáns klónokat is készítettünk, melyekből egy vagy több sushi domént kihagyunk. E mutáns klónokat az 1-es sushi domén kivételével sikerült expresszálni. Ezt követően a pályázat keretében ez a munka megszakadt, az e tevékenységben résztvevő Dr. Balogh István távozott a munkacsoportból, e témára önálló OTKA pályázatot nyújtott be, melyet ez évben az OTKA bizottság jóváhagyott.

3/ A FXIII szerepe a thrombocyták funkciójában

*a. A FXIII szerepe a thrombocyták adhéziójában*

A pályázatot megelőzően már kimutattuk, hogy a FXIII hiányos betegek monocytáinak phagocytosis csökken. Mivel a thrombocyták adhéziója a phagocytosis számos analógiát mutat ezen előzetes kísérleteket tovább folytattuk, s kimutattuk, hogy a FXIII hiányos monocytákban mind az ellenanyag, mind a komplement függő receptor mediált phagocytosis csökkent, elsősorban az internalizáció csökkenése miatt. Kimutattuk, hogy a monocyták macrophagokká történő differenciálódása során a FXIII mRNS szintézise a phagocytosis hatékonyságával párhuzamosan fokozódik, és a phagocytosis fokozó stimulusok a FXIII szintézisét is fokozzák. Az e munkából elkészült publikációt a Cellular Immunology-ban közzétettük. Ez volt az első olyan közlemény, mely a celluláris FXIII phagocytosisban játszott szerepét bizonyítja.

FXIII-A hiányos heparinnal alvadásgátolt betegek vérével a thrombocytá adhéziót és a thrombusképződést vizsgáltuk áramlási körülmények között. Izraeli kollaborációban hét FXIII-A hiányos beteg vérére alkalmazva kimutattuk, hogy a thrombocyták adhéziója kollagén felszínhez, és a képződött thrombus magassága egyaránt csökken. A csökkenés FXIII pótló terápia (Fibrogammin-P kezelés) után vett vérrel nem volt kimutatható. Az eredmények azt igazolják, hogy az aktiválatlan FXIII áramlási körülmények között elősegíti a thrombocyták kollagénhez való adhézióját, s nagy nyíróerőnél a FXIII hozzájárul a von Willebrand faktor mediálta thrombocytá adhézióhoz és a fibrinogén mediálta thrombocytá-thrombocytá kölcsönhatáshoz.

*b. FXIII által kovalensen módosított fibrin(ogén) felszín thrombocytá adhéziós tulajdonságának vizsgálata*

Kifejlesztettünk egy olyan technikát, melynek segítségével a felszínhez kötött fibrinogén trombinnal fibrinné alakítható, s aktivált FXIII-mal mind a fibrin, mind a fibrinogén keresztbe köthető. Statikus és áramlási körülmények között, utóbbi esetben különböző nyíróaránynál (100/sec-től 2600/sec) megvizsgáltuk, hogy a keresztalkotés hogyan befolyásolja a thrombocyták fibrinhez, illetve fibrinogénhez történő adhézióját. Mind a két esetben azt találtuk, hogy a keresztalkotés hatására az adhézió lényegesen csökkent, s ez különösen kifejezett volt az artériás áramlási viszonyoknak megfelelő magas nyíróarány esetén. Atomerő mikroszkóp segítségével kimutattuk, hogy az adherált thrombocyták morfológiáját a keresztalkotés nem befolyásolja. Eredményeink azt bizonyítják, hogy a FXIII indukálta keresztalkotések a fibrinhez történő thrombocytá adhéziót leregulálják, s ez által fontos limitáló szerepet játszanak az artériás rendszerben kialakuló thrombusok növekedésében. Az elkészült közleményt publikációra benyújtottuk.

*c. A thrombocytá FXIII sorsa és szerepe a thrombus érése során*

Fibrinogén oldatban lévő thrombocytá szuszpenzióban, ill. ennek granulocytákkal kiegészített változatában vizsgáltuk a trombin adását követően képződött fibrin keresztalkotését. Megállapítottuk, hogy a thrombocytákból még hosszú (4 órá) inkubáció után is csak minimális FXIII kerül ki, s így a fibrin keresztalkotése is minimális. Eredményeink szerint a thrombocytákban lévő nagy mennyiségű FXIII az alvadékba még granulocyták jelenlétében sem szabadul ki, s gyakorlatilag csak a plazma FXIII vesz részt a fibrin keresztalkotésében. Granulocyták jelenlétében meglepetésünkre gyakorlatilag teljes fibrinolízis következett be, így a fibrin keresztalkotéséről nem beszélhattunk.

Amennyiben nem tiszta fibrinogén oldatból indultunk ki, hanem teljes plazmából a granulocytá mediált „alternatív” fibrinolízis jóval kisebb mértékű volt, bár a granulocyták számának emelésével és az inkubációs idő hosszabbodásával fokozódott. Kísérleteket végeztünk FXIII hiányplazmával ill. FXIII mentes fibrinogénnel annak érdekében, hogy felderítsük a FXIII esetleges védő szerepét a granulocyták által mediált fibrinolízisben. Úgy találtuk, hogy a FXIII sem tisztított rendszerben, sem plazma körülmények között nem tölt be védő szerepet és nem befolyásolja a lízis mértékét.

A kísérletek során mintegy mellékletként igen érdekes felfedezést tettünk. Kiderült, hogy a granulocytá proteázok igen gyorsan lebontják a plazma FXIII A és B alegységét, s ez a hatás, bár valamivel lassabb, de jelentős a plazmából képződött fibrin alvadékban is. Ez azért fontos, mert a plazma FXIII fibrin alvadékban történő

eddig ismeretlen down-regulációjának egyik fontos mechanizmusának tartható. Megkíséreltük a mechanizmusban résztvevő proteázokat is identifikálni, specifikus proteáz inhibitorok segítségével. Kiderült, hogy a FXIII proteolízisében az elasztáz játszik fontos, bár korántsem kizárólagos szerepet. A katepszin G és a matrix-metalloproteáz 9 szerepe kevésbé fontos. E proteázok inkább az elasztáz által képzett elsődleges lebontási termékek további hasításában játszanak szerepet (gátlásuk esetén a FXIII A alegységből keletkezett 53 és 55 kD hasadási produktumok felszaporodnak). A plazma fő elasztáz inhibitora, az  $\alpha_1$  antitripszin jelentős védő hatással bír a FXIII alegységek granulocytá proteázok által történő lebontásával szemben, azonban ez a gátlás közel sem teljes. Utóbbi magyarázza, hogy plazmából képződött alvadékban is jelentős a FXIII alegységek lebontása. E most elkészült munkából sikeres előadást tartottunk a Basel-i FXIII szimposiumon, a közlemény összeállítása folyamatban van.

#### 4. Faktor XIII-at gátló peptidek előállítása és hatásuk vizsgálata

E részfeladat a terveknek megfelelően 2004-ben kezdődött.  $\alpha_2$  plazmin inhibitor ( $\alpha_2$ PI) N-terminális peptidjének (mely korábbi eredményeink szerint az aktivált FXIII kitűnő szubsztrátja) megfelelő szubsztrát analógokat állítottunk elő és megvizsgáltuk ezeknek a transzglutamináz reakcióban kifejtett gátló hatását, ill. kompetitív szubsztrát funkcióját. Eddig a következő eredményeket kaptuk: a dodekapeptid C-terminális lizin reziduumának az elhagyása nem befolyásolja lényegesen a FXIIIa aktivitását, azaz a 11 tagú peptid is jól alkalmazható szubsztrátként. További reziduumok elhagyása a 7-tagú peptidig csökkenti a peptid szubsztrátként való felhasználhatóságát, amely ennél kisebb peptid esetén megszűnik. A 12 tagú peptid 4-es pozíciójában lévő glutamin aszparaginra cserélése csökkenti a katalitikus effektivitást, azaz ennek a reziduumnak szerepe van a hatékony enzim szubsztrát kapcsolatban. A 2-es pozícióban lévő glutamin aszparaginra való cserélését követően a peptid megszűnik szubsztrátként funkcionálni, ugyanakkor gátolja a FXIIIa aktivitását. Ha a 2-es és 4-es pozícióban lévő glutamint egyaránt aszparaginra cseréljük a gátló hatás csökken. Tekintettel arra, hogy a jelenleg rendelkezésünkre álló peptid gátló hatása még nem éri el azt a mértéket, mely in vivo kísérleteket megalapozhat, gátló hatást mutató peptidből kiindulva a molekula modellezést is igénybe véve még hatékonyabb gátló peptidek (vegyületek) kialakításán dolgozunk.

## **II. Klinikai FXIII kutatások**

### 1/ A FXIII meghatározására és kimutatására szolgáló módszerek kidolgozása, illetve továbbfejlesztése

#### *a. Kinetikus kromogén teszt a FXIII aktivitás mérésére*

Rájöttünk, hogy egyes a kereskedelemben forgalmazott FXIII assay-k súlyos FXIII hiányos betegek esetében lényegesen fölélik a plazma FXIII szintjét. Ez a beteg állapotának és a terápia hatékonyságának megítélésénél komoly problémákat okoz. Kiderítettük, hogy ennek oka a reakció elegyben lévő glutamin szubsztrátból nem FXIII által enzimatikusan felszabaduló ammónia, illetve a plazmában jelenlévő piruvát lebomlásából származó NADH konszumpció. Kimutattuk, hogy a FXIII aktivitás gátlása mellett mért plazmavak beiktatásával a fölélmérés kiküszöbölhető. A korábban kifejlesztett UV kinetikus tesztünkben jóacetamiddal gátoltuk a FXIIIa aktivitást, s az így előállított plazma vak levonásával a problémát kiküszöböltük. A munkából a közlemény a Journal of Thrombosis and Haemostasisban jelent meg.

Kimutattuk, hogy a FXIII koncentrációjának mérésére módszerünk akkor is alkalmazható, ha a FXIII koncentrációjának hígítása pufferrel történik, míg a Behring-Dade módszer csak akkor, ha a hígítást FXIII hiányos plazmával végzik. Az ezzel kapcsolatos közlemény összeállítás alatt van.

A FXIII aktivitás mérésére szolgáló kinetikus UV és ELISA tesztünket alkalmazva részt vettünk az első FXIII WHO plazma standard kidolgozásában, ill. annak koordinálására alakult FXIII Standardization Working Group munkájában. A standardizációval kapcsolatos közlemény rövidesen elkészül, a szintén ezzel kapcsolatos nomenklaturáról szóló közleményünket a J Thromb Haemost közlésre elfogadta.

A trombinnal és  $\text{Ca}^{2+}$ -val aktivált FXIII által katalizált transzglutamináz reakció során felszabadult ammóniát glutamin szintetáz enzimmel glutamátba építettük be, miközben ADP-ből ATP keletkezett. Az ADP-t piruvát kinázzal visszaalakítottuk ATP-vé, s a keletkező piruvát mennyiségét piruvát oxidáz-peroxidáz reakcióval kromogén szubszttráttal mértük. A reakció működött, de linearitása meglehetősen limitáltnak bizonyult, ezért több más lehetőséget is kipróbáltunk. E próbálkozások közül a nagy érzékenységgű "scintillation proximity assay" kidolgozása a FXIII (és általában a transzglutaminázok) mérésére volt igazán sikeres. A biotinált glutamin oldalláncokat tartalmazó szubszttrátot streptavidinnel fedett scintillációs mikrotiter lemezhez kapcsoltuk és a transzglutaminázok által kovalensen a peptidhez kötött radioaktív aminoszubszttrát szintillációt idézett elő a lemezben, amit megfelelő mérőeszközzel kvantitatíve mérni lehet. A módszert és a módszer levizsgálásának eredményeit az Analytical Biochemistry-ben közzétettük.

*b. Módszer kifejlesztése a FXIII-A intracelluláris kimutatására áramlásos citometriával és a módszer alkalmazása az akut myeloid leukaemiák (AML) tipizálásában*

A monocyta eredetű akut myeloid leukémiák (AML) pontos azonosítását igen megnehezíti, hogy nem rendelkezünk megbízható markerekkel mely a teljes monocyta érés során kimutatható lenne. Ennek megfelelően a myeloblastos és monoblastos leukémiák elkülönítése gyakran nehézségekbe ütközik. Vizsgálataink során arra kerestünk választ, hogy (i) milyen az intracelluláris FXIII-A megjelenés különböző akut myeloid leukémiákban (ii) milyen a FXIII-A reakció szenzitivitása és specifitása különböző myeloblast és monoblast sejtvonalakon (iii) mennyire használható a teszt reziduális betegség kimutatására. A klinikai minták vizsgálata során 86 de novo AML, 6 krónikus myelomonocytás leukémia és 12 normál minta (7 csontvelő és 5 perifériás vér) analízisére került sor 3 színű áramlási citometriai analízissel. A FAB beosztás szerinti M0, M1 és M2 AML típusokban megjelenő blastokban a FXIII-A intracitoplazmatikus megjelenése átlagosan 10% alatt volt, míg M4 és M5 típusú AML-ekben 50% feletti pozitivitás mutatkozott. A FXIII-A szenzitivitása az M4 és M5 altípusokban jelentősen meghaladta az általánosan alkalmazott CD14 reakció szenzitivitását. A fluoreszcencia intenzitások analízisekor azt találtuk, hogy ellentétben pl. a myeloperoxidázzal a FXIII-A reakció intenzitása magasabb a leukémiás sejtekben, mint a normál monocytákban. A FXIII-A reakció jóval érzékenyebbnek mutatkozott reziduális betegség kimutatására is. A sejtkultúrák analízise azt mutatta, hogy a myeloblast érése során nem expresszálódik FXIII-A míg a monoblastok érése során jóval megelőzi a CD14 megjelenését és szenzitívebb mint a CD64. Eredményeink alapján a FXIII-A megbízható intracitoplazmatikus marker a M4, M5 M7 AML-ben és a krónikus myelomonocytás leukémiában. A munkából elkészült közlemény a Thrombosis and Haemostasis folyóiratban jelent meg.

*c. FXIII szint meghatározása a thrombocyta rendszer kvantitatív rendellenességei esetében*

Az autológ perifériás vér összejt transzplantáció előkészítésekor alkalmazott csontvelő abláció során mind a monocyta, mind a thrombocyta szint rendkívül erősen csökken, a monocyta szint azonban ezt követően gyorsan, míg a thrombocyta szint lassan, mintegy 2 hét múlva kezd emelkedni, s a 4. hétre visszatér az eredeti szintre. A plazma FXIII aktivitás és koncentráció a thrombocytaszám csökkenésével párhuzamosan csökken és a két paraméter (thrombocyta szám és FXIII szint) szignifikáns korrelációt mutatott. A monocytaszám csökkenésével ilyen korrelációt nem találtunk. Az csontvelő aplasiás fázisban a thrombocytaszám csökkenése mintegy 95 %-os, ezzel szemben a FXIII csökkenés csak 25 %-os volt. A változás időbeli kinetikájának az elemzése azt bizonyítja, hogy csontvelő aplasiás betegekben – ellentétben az egészséges egyénekkel – extra-haematopoietikus sejtek is szintetizálják az FXIII-A alegységét. E munkából készült közleményt a Blood Coagulation and Fibrinolysis közölte.

Elvégeztük a magas thrombocytaszámmal járó myeloproliferatív megbetegedésekben is a plazma FXIII aktivitás és szint meghatározását. Eredményeink azt mutatják, hogy mind essentialis thrombocytaemiában, mind egyéb myeloproliferatív megbetegedésben a FXIII szintek megemelkednek. Néhány igen nagy thrombocyta számmal járó esetben extrém magas FXIII szinteket lehetett mérni. A betegek hidroxüreával történő kezelése csökkenti a thrombocytaszámot és ezzel párhuzamosan az FXIII szintet is. Az eredmények azt mutatják, hogy a nagy mennyiségben képződött, sérülékeny, magas turnover-ű thrombocytákból kikerülő FXIII-A résztvesz a plazma FXIII szint kialakításában. Feltételezzük, hogy a magas FXIII szint hozzájárul e betegek fokozott thrombosis hajlamához. A munka elkészült, az ebből készült közleményt összeállítottuk.

Különböző destruktív és hyporegeneratív thrombocytopeniás betegek FXIII szintjének vizsgálata jelenleg is folyik.

A thrombocyta rendellenések vizsgálatát ki kívántuk terjeszteni a kvalitatív thrombocyta rendellenességekre is, hiszen előkísérleteink szerint pl. Glanzmann thrombastheniában a thrombocyta fehérjék FXIIIa által történő keresztkötése módosul. E vizsgálatokhoz jelenleg a Glanzmann thrombastheniás betegek molekuláris genetikai és fehérje biokémiai karakterizálása folyik. Az első ilyen beteg vizsgálatának eredményeit a Thrombosis and Haemostasis folyóirat közölte, a második beteg vizsgálata is befejeződött, ennek anyagát nemzetközi kongresszuson prezentáltuk, a közlemény összeállítása folyamatban van.

*d. A FXIII Val34Leu polimorfizmus és FXIII szint, illetve aktivitás meghatározás occlusiv arteriás megbetegedésben*

Felmérve, hogy a tervezett kísérletekhez szükséges nagyszámú Val34Leu polimorfizmus meghatározás szükséges kiderült, hogy a hagyományos PCR-RFLP technikával a vizsgálatok rendkívül hosszú időt vennének igénybe. Ezért a Val34Leu polimorfizmus meghatározására kidolgoztunk egy új „real-time” PCR-t alkalmazó módszert, melyben a különböző genotípusokat fluorescens rezonancia energia transzfer segítségével olvadási görbe analízissel detektáljuk. Az új módszert Roche LightCycler készülékre adaptáltuk, a hagyományos PCR-RFLP-vel és DNS szekvenálással az új módszer 100 %-os egyezést mutatott. Módszertani közleményünk a Clinical Chemistry and Laboratory Medicine folyóiratban jelent meg.

### Myocardiális infarctus

A vizsgálatok 955 egymást követő, coronaria angiographiával vizsgált betegen történtek. A coronaria sclerosis (CS) diagnózisát a coronarographiával  $\geq 50\%$  szűkületet mutató betegcsoport esetében, a myocardiális infarctus (MI) diagnózisát a WHO ajánlásai alapján pozitívnak bizonyuló esetekben mondtuk ki. A betegeket a következő csoportokba osztottuk: CS-MI- (klinikai kontrollok), CS+MI-, CS-MI+ and CS+MI+. A vizsgálatok első részében meghatároztuk a plazma FXIII aktivitását és a FXIII antigén koncentrációját. A 4 csoport között nem találtunk szignifikáns különbséget az adjusztált FXIII szintekben. Ha elvégeztük a nemek szerinti bontást nők esetében a CS+MI+ csoportban szignifikánsan magasabb FXIII aktivitás és antigén szinteket találtunk mint a CS+MI- csoportban. Férfiaknál ilyen különbség nem volt észlelhető. Emellett kimutattuk azt is hogy nők esetében az emelkedett FXIII szint szignifikáns rizikó faktor a myocardiális infarctusra. (A FXIII aktivitás és antigén felső harmadában lévő nők esetében a rizikó arány 2.180 (1.230-3.864,  $p=0.008$ ), ill. 2.294 (1.297-4.058,  $p=0.004$ ) volt. Az emelkedett FXIII szint egyik nemben sem jelentett fokozott rizikót a coronaria sclerosisra. Az e munkából készült közleményt benyújtottuk közlésre.

A vizsgálatok második részében a FXIII-A Val34Leu polimorfizmusát vizsgáltuk a fenti betegcsoportban. E polimorfizmus előfordulását akut myocardiális infarctusban (AMI) és coronaria sclerosisban (CS) több tanulmány vizsgálta, az eredmények azonban ellentmondóak. Több szerző számolt be arról, hogy a FXIII-A Leu34 allél hordozása védő hatású AMI-val szemben, azonban más munkacsoportok ezt nem erősítették meg. Magyarországon az AMI/CS előfordulása az egyik legmagasabb az európai államok között, ezért különösen érdekes annak vizsgálata, hogy a Leu34 allél hordozása protektív-e. Nem találtunk ilyen protektív hatást, ugyanakkor az allél hordozása fokozott rizikót sem jelentett. Jelenleg az irodalomban megjelent adatok és saját adataink metaanalízise folyik (ilyen analízis eddig nem jelent meg), aminek befejezése 2006 első félévében várható. Kimutattuk e mellett, hogy a faktor Val34Leu polimorfizmus egyik betegcsoportban sem befolyásolta a plazma FXIII specifikus aktivitását. Ugyanakkor myocardiális infarctuson átesett Leu34 homozigóták esetében a FXIII aktivitása és antigén szintje is kb. 10%-kal alacsonyabb volt a vad típusúakénál.

Mintegy 300 perifériás érbetegnél is meghatároztuk a FXIII-A Val34Leu polimorfizmust, a plazma FXIII aktivitást és antigén szinteket. Kimutattuk, hogy okkluzív perifériás érbetegségben a FXIII szint szignifikánsan, mintegy 12-15 %-kal magasabb, mint a kontroll egyénekén. Ugyanakkor a FXIII-A Leu34 allél jelenléte sem hetero-, sem homozygota formában nem befolyásolja a betegség előfordulási gyakoriságát, illetve súlyosságát. Az közleményt jelenleg állítjuk össze.

### *e. FXIII szint különböző testfolyadékokban és e szintek változásai gyulladásos megbetegedésekben*

A tervezett kísérletek közül először a bronchoalveolaris mosófolyadékban történő FXIII meghatározásokat végeztük el. A korábban kifejlesztett igen érzékeny két immunoassay-énkkal el tudtuk különíteni a celluláris (FXIII A<sub>2</sub>) és plazma (FXIII A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>) faktort és meg tudtuk határozni mindkettőnek a koncentrációját a bronchoalveolaris mosófolyadékban. Egészséges gyermekek esetében, ahol a lavage nem igazolódott idegentest feltételezése miatt történt, kis mennyiségű celluláris FXIII-t találtunk a mosófolyadékban, míg plazma FXIII nem volt észlelhető. Chronicus bronchitis, illetve fibrotikus alveolitis esetén a celluláris FXIII szintje átlagosan a normális 4-5-szörösére emelkedett a bronchiális mosófolyadékban.



Áramlásos citometriával kimutattuk, hogy a bronchoalveolaris mosófolyadékban lévő sejtek közül egyedül az alveolaris makrophagok tartalmaznak FXIII-at, így a celluláris FXIII minden valószínűség szerint e sejtekből származik, s mennyisége minden valószínűség szerint e sejtek aktivitását tükrözi. A legtöbb betegben a plazma FXIII is megjelent, ami fokozott capilláris permeabilitásra utal. Feltételezzük, hogy a FXIII lényeges szerepet játszik a a tüdő krónikus, gyulladásos megbetegedéseiben képződött fibrin turn-overének a szabályozásában, s így e betegségek pathomechanizmusában. A munkából a közlemény a Journal of Thrombosis and Haemostasis folyóiratban jelent meg.

Az egészséges egyének és gyulladásos, ill. degeneratív megbetegedésben szenvedők ízületi folyadékából és a liquorából történő FXIII meghatározások folynak, a megfelelő számú minta összegyűjtése azonban időigényes és e munka befejezése csak kb. egy év múlva várható.

#### *f. Molekuláris genetikai vizsgálatok FXIII hiányos betegeken*

Tekintettel arra, hogy a 2 magyarországi FXIII hiányos beteg mutációi az irodalomban már leírt mutációknak bizonyultak, a további vizsgálatok iráni betegek plazma és DNS mintáin történtek. A mintákat Flora Peyvandi-tól iráni származású olasz kollaborációs partnerünktől kaptuk. 10 nem rokon iráni beteg esetében végeztük el a fenotípus-genotípus analízist. Két különböző transzglutamináz méréssel csak azon betegeknél találtunk mérhető aktivitást, akik profilaktikus szubsztitúciós terápián voltak. Hasonló eredményt adott a plazma FXIII komplex és a plazmában lévő FXIII-A alegységek immunoassay-vel történő meghatározása. A genotípus meghatározásoknál a FXIII-A génben 4 új mutációt (2 misszenz és 2 kis deléciót) találtunk, és 2 korábban már közölt misszenz mutációt is észleltünk. A misszenz mutációk strukturális következményeit molekula modellezéssel és energetikai számításokkal kíséreltük meg kideríteni. A mutációk az alábbi arginin rezidumok cseréjét eredményezték: Arg77His, Arg260Cis, Arg260His és Arg382Ser. Az első aminosav csere a FXIII-A  $\beta$  sandwich doménjében, az utóbbi négy a központi doménben található. Valamennyi mutáció az argininhez kapcsolódó extenzív és strukturális szempontból fontos hidrogénkötés hálózatot szüntette meg vagy károsította. Az energia dekompozíciós analízis azt mutatta, hogy ez a helyzet a molekula instabilitásához és feltehetően a inkorrekt folding-jához vezet, ami magyarázza a súlyos FXIII hiányt. Az eredményeket a Human Mutation folyóiratban közzétettük.

Előzetes feltételezésünkkel szemben funkcionális FXIII „deficienciához” vezetett egy olyan rendellenesség, melyben a véralkadás V-ös faktorának (FV) FXIII által történő kereszt-kötése gátolt volt és a FV aktivitás is jelentősen csökkent. A FV gént megszekvenáltuk, és semmiféle genetikai eltérést nem találtunk, ezzel szemben kimutattuk, hogy az idős gastrointestinális vérzésektől szenvedő nőbetegben olyan IgG típusú auto-antitest található, mely a a FV könnyűláncon a molekula C2 doménjéhez kötődik, neutralizálja az aktív FV prokoaguláns aktivitását és gátolja kereszt-kötését. Az auto-antitest karakterizálását a Journal of Thrombosis and Haemostasis-ban közzétettük.

E témakörhöz kapcsolható a FXIII sebgyógyulásban játszott szerepének vizsgálata. Klinikai megfigyelések utaltak arra, hogy egyes FXIII hiányos betegek esetében a sebgyógyulás kóros, azonban ennek exakt bizonyítására soha nem került sor. Izraeli és német kollaborációban kimutattuk, hogy az incíziós sebek záródása FXIII-A hiányos transzgén egereken jelentősen elhúzódó volt és a sebgyógyulás során bekövetkező szövettani változások kórosak voltak. Plazma FXIII pótló terápia esetén

a sebgyógyulás normalizálódott. Kísérleteinkben először szolgáltatunk exakt bizonyítékot arra, hogy a FXIII-A genetikai hiánya csökkent sebgyógyuláshoz vezet, s ez a plazma és nem a celluláris FXIII hiányának köszönhető. Az e munkából megjelent közleményt a Thrombosis és Haemostasis folyóirat közölte.